

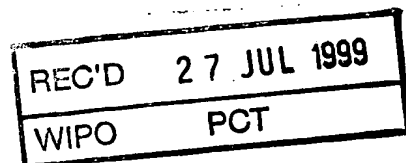
09/720006 RA
PCT/EP 99/04310

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



22. Juni 1999



EP 99
4310

Bescheinigung

EJU

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verbesserung der Sensitivität von Bindeassays durch
Multiepitopenalyse und Kombination von Antigen- und
Antikörper-Bestimmung"

am 22. Juni 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
G 01 N 33/543 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. April 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Faust

Aktenzeichen: 198 27 714.8

PATENTANWÄLTE
European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68
eMail weickmann@compuserve.com

Unser Zeichen:
17316P DE/WWMDvsvo

Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Strasse 112-132

68305 Mannheim-Waldhof

Verbesserung der Sensitivität von Bindeassays durch Multiepitopenalyse
und Kombination von Antigen- und Antikörper-Bestimmung

Verbesserung der Sensitivität von Bindeassays durch Multiepitopenalyse und Kombination von Antigen- und Antikörper-Bestimmung

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe, wobei der Nachweis des Analyten mit unterschiedlichen, an den Analyten bindefähigen Reagenzien geführt wird.

10 Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Festphase zum Nachweis eines Analyten, wobei die Festphase einen nichtporösen Träger und räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei jede Testfläche unterschiedliche Reagenzien enthält. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses
15 Antigen gerichteten Antikörpers sowie eine Festphase zur Durchführung dieses Verfahrens.

Eine Vielzahl von Analyten kann durch immunologische Nachweisverfahren bestimmt werden. Solche immunologische Nachweisverfahren nutzen die
20 spezifische Bindefähigkeit von Analyten mit bestimmten Reagenzien, wie beispielsweise Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Grundsätzlich können immunologische Bestimmungen in einer Reihe von Testformaten durchgeführt werden, wie etwa dem Sandwichtestformat, dem indirekten Testformat, dem Rücktitrationsformat oder dem Brückenformat.

25

Ein zuverlässiger Nachweis von Infektionserkrankungen, z.B. einer Infizierung mit Viren wie etwa HIV, HBV oder HCV, ist von besonderem Interesse, um die Erkrankung bei betroffenen Personen möglichst frühzeitig diagnostizieren zu können. Im Allgemeinen werden immunologische
30 Bestimmungen von Antikörpern gegen HIV, HBV oder HCV im indirekten Testformat oder mittels Brückenformat durchgeführt. Zum Nachweis der Antikörper werden dabei zumeist Gemische verschiedener Proteine bzw.

Peptide verwendet, die Epitope aus der Core- und Envelope-Region des Erregers umfassen. Dieses Gemisch wird auf einem Träger, d.h. einer Festphase, immobilisiert. Da die Einstufung als HIV-positiv für den Einzelnen von großer Bedeutung ist und falsch positive Ergebnisse fatale Folgen haben können, ist es derzeit notwendig, alle bei dieser immunologischen Bestimmung in Routinetests erhaltenen positiven Ergebnisse in einem Bestätigungstest zu überprüfen. Als Bestätigungstest wird üblicherweise ein Westernblot verwendet, bei dem die einzelnen Proteinbestandteile eines Viruslysats auf einen porösen Träger aufgeblottet sind. Im Fall von HCV ist es allerdings sehr schwierig, den Virus zu züchten. Deshalb wird hier als Bestätigungstest kein Westernblot mit Viruslysat sondern ein RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) durchgeführt, bei dem es sich um einen Immunodotblot, der rekombinante Proteine bzw. Peptide als Testreagenzien umfaßt, handelt.

Ein großer Nachteil der derzeit verwendeten Routinetests besteht darin, daß je nach Analyt Gemische von 5 bis 10 oder mehr Antigenen zum Nachweis eingesetzt werden. Zwar werden die Routinetests laufend verbessert, ein vollständiger Verzicht auf Bestätigungstests konnte jedoch noch nicht erreicht werden. Beispielsweise wird im Enzygum® HIV-Test (Boehringer Mannheim) ein Gemisch aus ca. 5 verschiedenen Antigenen verwendet, welche für den Nachweis sowohl biotinyliert als auch Digoxigenin-markiert sind. Obwohl der Test gut funktioniert, bedeutet die Verwendung von Antigengemischen mit einer derart hohen Anzahl verschiedener Antigene, daß die einzelnen auf der Festphase immobilisierten bzw. gebundenen Antigene nicht mehr in einer für den Nachweis optimalen Konzentration vorliegen können. Die Bindekapazität der Festphase ist bei einem solchen Gemisch aus einer Vielzahl von Komponenten nicht mehr ausreichend, um alle Antigene in der optimalen Konzentration zu binden. Weiterhin hat die Verwendung eines Antigen-Gemisches bei der Beschichtung einer Testfläche zur Folge, daß die verschiedenen Antigene um die Bindungsstellen auf der Festphase kompetieren und die unterschiedlichen

Größenverhältnisse zu unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten und zu unterschiedlichen sterischen Effekten führen. Bei einer Direktbeschichtung werden z.B. hydrophobe Antigene bevorzugt an die Kunststoffoberfläche gebunden, während gleichzeitig hydrophilere Antigene verdrängt werden. Dies führt dazu, daß zum einen nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden und zum anderen die Konzentration bestimmter Antigen-Epitope so gering wird, daß ein signifikanter Nachweis nicht mehr möglich ist.

Ein weiterer Nachteil der Verwendung von Antigengemischen in Routinetests liegt darin, daß durch das Gemisch unterschiedlicher Antigene die Gefahr einer erhöhten unspezifischen Bindung deutlich gesteigert wird, was wiederum zu einem Anstieg falsch positiver Ergebnisse führt. Dies bewirkt, daß bei den bisher verwendeten Routinetests die Cut-off-Grenze relativ hoch gesetzt werden muß und somit Sensitivität verloren geht. Vor allem im Westernblot nimmt aufgrund von im Viruslysate vorliegenden Fremdproteinen die Zahl der falschpositiven Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindung deutlich zu, so daß mindestens 2 reaktive Banden für ein positives Ergebnis gefordert werden.

Es wurde versucht, die Sensitivität dieser Nachweisverfahren weiter zu verbessern. EP O 461 462 A1 beschreibt einen Immunoassay zum Nachweis von viralen Antikörpern mit Hilfe eines indirekten Testkonzepts. Bei dem in EP O 461 462 A1 beschriebenen Immunodotblot werden anstelle eines üblichen Viruslysats aufgereinigte rekombinante Proteine einzeln in diskreten Testflächen auf einen porösen Träger aufgetragen, wobei ein Testformat erhalten wird, das aufgrund der Verwendung aufgereinigter Proteine sensitiver als ein Westernblot ist.

EP O 627 625 A1 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von viralen Antikörpern in einer Probe mittels Brückenkonzept. Auch bei diesem Verfahren handelt es sich um einen RIBA (Recombinant Immunoblot Assay),

bei dem mehrere Antigene räumlich getrennt auf eine Festphase aus einem porösen Material aufgebracht werden, wobei auf die Notwendigkeit der Verwendung einer Festphase aus porösem Material hingewiesen wird.

5 EP 0 445 423 A2 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von HCV-Antikörpern mit Hilfe mehrerer Epitope eines HCV-Antigens. Auch in EP 0 445 423 A2 wird ein Immunodotassay zur Antikörperbestimmung beschrieben, wobei eine höhere Sensitivität durch die Verwendung bestimmter, verbesserter Antigene erzielt wird.

10

Bei diesen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren ist jedoch aufgrund der Verwendung eines porösen Trägers das definierte Aufbringen einer vorbestimmten Reagenzmenge schwierig. Insbesondere besteht die Gefahr des Ineinanderlaufens der einzelnen aufgetragenen Testspots. Diese Nachteile werden um so gravierender, je kleiner die aufgetragenen Spots werden, so daß diese Verfahren insbesondere für miniaturisierte Testsysteme nicht geeignet sind. Außerdem ist die Handhabung von Papierstreifen schwer automatisierbar und somit als Routinetest nicht denkbar.

20

Eine Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, durch das die im Stand der Technik auftretenden Nachteile zumindest teilweise beseitigt werden können.

25

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

30

- (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten, die spezifisch an verschiedene Epitope des zu bestimmenden Analyten binden,

- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

Der immobilisierte analytspezifische Rezeptor kann sowohl direkt als auch indirekt über einen oder mehrere Rezeptoren an die Festphase gebunden sein. Die Bindung kann beispielsweise durch adsorptive oder kovalente Wechselwirkungen, bevorzugt jedoch durch spezifische hochaffine Wechselwirkungen, z.B. Streptavidin oder Avidin/Biotin oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen erfolgen.

Der freie analytspezifische Rezeptor kann selbst eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sein. In diesem Fall besteht das Nachweisreagenz aus mehreren Komponenten.

Bei dem Analyten kann es sich um eine homogene oder um eine heterogene Population, z.B. eine heterogene Antikörperpopulation handeln. Die einzelnen Testflächen binden im Fall von heterogenen Analytpopulationen eine Teilpopulation des zu bestimmenden Analyten. Bevorzugt ist der Analyt ein Erreger oder/und ein Pathogen. Die ersten Rezeptoren binden dabei erfindungsgemäß an verschiedene Epitope oder/und Subtypen des Analyten.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Sensitivität von Nachweistests, wie etwa Antikörpertests, durch die Verwendung von Paneltests, bei denen die verschiedenen Reagenzien, z.B. verschiedene Antigene als Einzelspots aufgetragen werden, deutlich verbessert werden kann. Durch die erfindungsgemäße Multiepitopanalyse, d.h. den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Antigene oder Epitope eines Analyten oder Erregers, wie etwa HIV, kann die Sensitivität und Zuverlässigkeit von Nachweistests erheblich gesteigert werden.

Wenn auf zwei oder mehr Testflächen ein positives Testergebnis erhalten wird, wird dies als Vorhandensein des Analyten in der Probe gewertet.

5 Durch die erfindungsgemäße Verwendung eines nichtporösen Trägers, ist es möglich, die Reagenzien in definierten Flächen aufzubringen. Dies ist insbesondere bei miniaturisierten Testformaten von Bedeutung. Entsprechend weisen die Testflächen bevorzugt einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm, mehr bevorzugt von 0,1 bis 0,5 mm und am meisten bevorzugt von 0,1 bis 0,2 mm auf.

10 Bevorzugt werden Festphasen mit mehreren Testflächen verwendet, die auch als Array-Systeme bezeichnet werden. Solche Array-Systeme sind z.B. bei Ekins und Chu (Clin. Chem. 37 (1995) 1955-1967) und in den US-Patenten 5,432,099, 5,516,635 und 5,126,276 beschrieben.

15 Die erfindungsgemäß verwendete Festphase umfaßt einen für Nachweisverfahren verwendbaren, nichtporösen Träger. Der nichtporöse Träger kann dabei aus einem beliebigen, nichtporösen Material bestehen. Bevorzugt umfaßt der Träger eine Kunststoff-, Glas-, Metall- oder Metalloxidoberfläche.
20 Besonders bevorzugt weist der Träger eine Polystyroloberfläche auf. Auf diesem Träger sind räumlich diskrete Bereiche (Testflächen) angeordnet. Auf diesen Testflächen sind Reagenzien, wie etwa immobilisierte Festphasenrezeptoren aufgebracht. Die Immobilisierung der Reagenzien auf den Testflächen erfolgt nach bekannten Methoden, z.B. durch direkte adsorptive Bindung, durch kovalente Kopplung oder durch Kopplung über hochaffine Bindepaare, z.B. Streptavidin/Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin.
25

Besonders vorteilhaft ist, wenn die räumlich getrennten Testflächen separat mit verschiedenen Reagenzien beladen werden. Durch die Einzelauftragung
30 der verschiedenen Testflächen können für jedes Reagenz, beispielsweise für jedes einzelne Antigen, die optimale Festphasenkonzentration und die optimalen Beschichtungsbedingungen z.B. in Form von speziellen

11.22.05.99

- 7 -

Pufferrezepturen gewählt werden. Dadurch ist es möglich, jedes einzelne Antigen bis zur maximalen Bindekapazität der Fläche zu beschichten, während bei den bisher bekannten Tests jedes Antigen nur zu einem Teil der verfügbaren Bindekapazität gebunden werden konnte. Durch die separate
5 Auftragung der verschiedenen Reagenzien findet außerdem keine Konkurrenz der einzelnen Reagenzien, beispielsweise der Antigene, um die Bindungsplätze auf der Festphase statt. Entsprechend ist es bevorzugt, nur ein Reagenz, das spezifisch mit dem zu bestimmenden Analyten bindefähig ist, pro Testfläche zu binden. Dieses Reagenz kann gegebenenfalls durch
10 inerte Verdünnermoleküle verdünnt werden, um eine optimale homogene Bindephase zu bilden. Inerte Verdünnermoleküle sind Moleküle, die an die Festphase binden aber keine Wechselwirkung mit dem Analyten oder anderen Probestandteilen eingehen. Geeignete Verdünnermoleküle sind beispielsweise in WO 92/10757 und in EP 0 664 452 A2 beschrieben.

15 Bei Testflächen, auf denen nur ein einziges mit dem Analyten bindefähiges Reagenz, wie etwa ein Antigen gebunden ist, wurde festgestellt, daß die unspezifische Bindung deutlich reduziert ist. So ist bei Auftragung verschiedener Antigene als Einzelspots keine meßbare unspezifische
20 Bindung zu beobachten, während ein Testspot, auf den ein Gemisch aus mehreren Antigenen aufgebracht wurde, eine deutlich meßbare unspezifische Bindung zeigt.

25 Der Nachweis des Analyten erfolgt im erfindungsgemäßen Verfahren auf bekannte Weise durch Verwendung der geeigneten Markierungsgruppen, z.B. Fluoreszenzmarkierungsgruppen. Alternativ kann, bei geeigneten Festphasen, die Wechselwirkung von Bestandteilen des Nachweismediums mit den Testflächen mit auch durch Bestimmung der Schichtdicke der jeweiligen Flächen z.B. durch Plasmonenresonanzspektroskopie,
30 nachgewiesen werden.

Die begrenzten Testflächen können darüber hinaus zur Unterscheidung gegenüber inerten Bereichen der Festphase eine nachweisbare und analytunspezifische Markierungsgruppe enthalten, die neben der analytspezifischen Beschichtungsgruppe nachweisbar ist und mit ihr nicht interferiert. Ein Beispiel für eine solche analytunspezifische Markierungsgruppe ist eine Fluoreszenz-Markierungsgruppe, die bei einer Wellenlänge fluoresziert, die von der Fluoreszenzwellenlänge einer analytspezifischen Markierungsgruppe verschieden ist. Die analytunspezifische Markierungsgruppe wird vorzugsweise, ebenso wie der Festphasenrezeptor, über ein hochaffines Bindepaar, z.B. Streptavidin/Biotin immobilisiert.

Eine weitere Sensitivitätssteigerung kann durch die Verwendung eines universellen Nachweisreagenzes erreicht werden. In der Regel werden pro Antigen ein Antigenkonjugat, welches die spezifische Markierung, wie etwa ein Enzym, einen Fluoreszenzmarker oder fluoreszierende Latexpartikel trägt, eingesetzt. Durch die Kombination mehrerer markierter Antigenkonjugate wird die Konzentration an Markierungen sehr hoch, so daß die unspezifische Bindung naturgemäß stark zunimmt. Dieses Problem kann durch die Verwendung eines universellen Konjugats gelöst werden. Erfindungsgemäß bevorzugt werden fluoreszenzmarkierte Latexpartikel als universelles Nachweismolekül verwendet. Dabei wird das Antigen mit einem Rezeptor 1 über eine kovalente Bindung verknüpft, während das Nachweismolekül mit einem Rezeptor 2, der mit dem Rezeptor 1 bindefähig ist, versehen wird. Die Bindung des Rezeptors 2 an das Latexmolekül kann adsorptiv oder auch kovalent über funktionelle Gruppen erfolgen. Als hochaffine Bindepaare sind z.B. Streptavidin/Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin geeignet. Bevorzugt wird das bekannte Dig/<Dig>-System verwendet.

Ein weiterer Nachteil der Brückenteste, die z.B. als 1-Schritt-Reaktion ausgeführt werden, ist, daß das Festphasenantigen (z.B. Bi-gp41) und das Nachweisantigen (z.B. Dig-gp41) im Verhältnis 1:1 angeboten werden

müssen, um ein optimales Signal zu erzielen. Dies ist nachteilig, da aufgrund der beschränkten Bindekapazität der Festphase die Konzentration der einzelnen Festphasenantigene suboptimal ist und somit auch für das Nachweisantigen nicht günstig liegen kann.

5

Da mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Festphasenantigene bereits auf der Festphase in optimaler Konzentration gebunden sind, kann auch das Nachweisantigen in optimaler Konzentration angeboten werden, da Antigen-Derivate mit Digoxigenin oder Biotin im Gegensatz zu Enzym-gelabelten Antigenen nur unwesentlich zu unspezifischer Bindung neigen. Man kann diese Reagenzien im vollen Überschuß einsetzen, so daß Impräzisionen in der Pipettierung der Antigenlösung nicht auf die Testimpräzision durchschlagen.

10

15 Durch spezifische Bindung des zu bestimmenden Analyten an das auf die Testfläche immobilisierte Reagenz, z.B. einen Festphasenrezeptor, kann das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in einer Probe bestimmt werden. Durch kombinierte Auswertung der verschiedenen Testflächen, die jeweils unterschiedliche, spezifisch mit dem Analyten bindefähige Reagenzien enthalten, kann die Sensitivität des Nachweisverfahrens, insbesondere durch eine Verringerung falsch positiver Ergebnisse und die zweifelsfreie Erkennung richtig positiver Ergebnisse, merklich verbessert werden. Von besonderem Interesse ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Erfassung bzw. Eliminierung von unspezifischen Bindungen bei qualitativen Tests mit hohen Anforderungen an die Spezifität, wie etwa bei Tests auf Infektionen (z.B. HIV).

20

25

Durch die erfindungsgemäße Verwendung von Arrays, d.h. Festphasen, die mindestens zwei, mehr bevorzugt mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens fünf, und bis zu eintausend, mehr bevorzugt bis zu einhundert räumlich getrennte Testflächen umfassen, ist es möglich, mindestens eine dieser Testflächen so auszugestalten, daß sie eine Kontrollfläche darstellt.

30

Folglich umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt die Verwendung einer Festphase, die zusätzlich mindestens eine, mehr bevorzugt zwei und am meisten bevorzugt mindestens fünf Kontrollflächen umfaßt. Durch die Integration von Kontrollspots in die Festphase ist es möglich, falsche Resultate aufgrund von Störungen leicht und schnell zu erkennen. Neben den spezifischen Testflächen, ist es weiterhin möglich, einen probenspezifischen Untergrund zu messen und damit einen probenspezifischen Cut-off zu definieren. Die Verwendung eines Testarrays und die Verwendung von Kontrollspots ermöglicht es, die Cut-off-Grenze abzusenken. Der Cut-Off-Wert ist ein Grenzwert, der bei Testverfahren eingesetzt wird, um zwischen positiven und negativen Werten unterscheiden zu können. Ein solcher Cut-Off-Wert ist insbesondere bei Testverfahren, welche Infektionskrankheiten betreffen, von Bedeutung. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich eine Positiv-/Negativ-Unterscheidung mit erheblich geringerer Fehlerwahrscheinlichkeit zu treffen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in beliebigen Nachweisverfahren eingesetzt werden, z.B. in Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays, Zucker-Lectin-Assays und ähnlichen Verfahren. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich grundsätzlich zum Nachweis beliebiger Analyten in einer Probe. Besonders geeignet ist es zum Nachweis eines Partners von spezifischen Bindepaaren. Aus diesem Grund werden die mit dem Analyten bindefähigen Reagenzien bevorzugt aus Proteinen, Peptiden, Antikörpern, Antigenen, Haptenen, Nukleinsäuren, Biotin und Streptavidin/Avidin ausgewählt. Die räumlich getrennten Testflächen können dabei mit Reagenzien beschichtet werden, die aus der gleichen oder verschiedenen der oben genannten Klassen stammen.

Während ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst darin besteht, die Sensitivität des Nachweises eines einzigen

11.22.05.99

- 11 -

Analyten zu verbessern, können bei geeigneter Wahl der Testflächen auch mehrere Analyten gleichzeitig mit hoher Sensitivität bestimmt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien enthalten, die spezifisch mit dem zu bestimmenden Analyten bindefähig sind.

Bevorzugt enthalten die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien, die an verschiedene Epitope oder/und Subtypen als Analyten binden.

Um eine möglichst große Anzahl von Testflächen auf einer Festphase unterzubringen, werden bevorzugt miniaturisierte Testformate verwendet. Der Abstand zwischen den einzelnen Testflächen wird so gewählt, daß ein Ineinanderlaufen der aufgetragenen Reagenzien nicht möglich ist. Üblicherweise reicht es hierfür aus, wenn die Ränder der Testflächen einen Abstand von 0,05 bis 5 mm aufweisen. Zwischen den Testflächen befindet sich bevorzugt eine inerte Oberfläche, die weder mit dem Analyten noch mit sonstigen Probestandteilen bindefähig ist.

Die erfindungsgemäße Festphase kann in beliebigen Nachweisverfahren eingesetzt werden, z.B. in Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays, Zucker-Lectin-Assays und dergleichen. Bevorzugt wird sie in einem Immunoassay zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen verwendet.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Testkit zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, welches eine erfindungsgemäße Festphase sowie markierte Nachweisreagenzien umfaßt. Markierte Nachweisreagenzien sind dem Fachmann bekannt und umfassen im allgemeinen eine Markierungsgruppe sowie eine spezifisch bindefähige Gruppe, die den Nachweis des Analyten

ermöglicht. Geeignete Markierungsgruppen sind z.B. Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-, Enzym-, radioaktive oder Partikel-(Sol)-Markierungsgruppen. Die spezifisch bindefähige Gruppe kann z.B. mit dem gebildeten Analytkomplex bindefähig sein oder bei kompetitiven Testformaten mit anderen Bestandteilen des Nachweissystems. Bevorzugt umfaßt der Testkit ein universelles Konjugat als Nachweisreagenz, insbesondere fluoreszenzmarkierte Latexpartikel.

Ein weiteres Problem herkömmlicher Routinetests besteht darin, daß die gleichzeitige Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer Messung nicht durchführbar ist. Aus diesem Grund wird bei sogenannten HIV-Kombinationstests beispielsweise eine Bestimmung des Antigens p24 und von Antikörpern gegen andere HIV-Antigene gleichzeitig durchgeführt. Bei einem solchen Test können dann lediglich Antikörper gegen andere HIV-Antigene, wie beispielsweise gp41 oder gp120 bestimmt werden, während die Bestimmung von Antikörpern gegen p24 nicht möglich ist.

US-PS-5,627,026 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis eines Antikörpers und eines Antigens in einer biologischen Probe. So wird beispielsweise ein Assay zur Bestimmung des FeLV-Antigens und des FIV-Antikörpers beschrieben. Auch gemäß dem Verfahren von US-PS-5,627,026 können bei der Bestimmung eines Antigens im gleichen Test lediglich Antikörper, die gegen andere Antigene gerichtet sind, nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers bereitzustellen. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens nämlich ein Verfahren zu gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifische gegen

dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer Probe gelöst, umfassen die Schritte

- (a) Bereitstellen einer Festphase, auf der in einer ersten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antigen bindefähiger immobilisierter Rezeptor und in einer räumlich davon getrennten zweiten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähiger immobilisierter Rezeptor aufgebracht ist,
- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

Der Nachweis des Antigens findet bevorzugt unter Verwendung eines Sandwichtests und der Nachweis des Antikörpers bevorzugt unter Verwendung eines Brückenkonzepts eines Rücktitrationskonzepts oder eines indirekten Testformats statt.

Bevorzugt wird der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung einer Rücktitration durchgeführt. Vorteilhaft ist dabei, daß bei Verwendung eines Sandwichtests zum Nachweis des Antigens keine gegenseitige Beeinflussung von Nachweismolekülen stattfinden kann, da in diesem Fall für den Nachweis des Antigens und Nachweis des Antikörpers das gleiche Nachweisreagenz verwendet werden kann. Für einen Sandwichtest zum Nachweis eines Antigens, z.B. p24, wird beispielsweise ein gegen dieses Antigen gerichteter Antikörper, z.B. <p24>, auf einer Testfläche immobilisiert. Als zum Nachweis dienender zweiter Rezeptor kann dann ein gegen das Antigen gerichteter markierter Antikörper, z.B. <p24>-Dig, verwendet werden. Zum Nachweis des entsprechenden, gegen das Antigen gerichteten Antikörpers, z.B. <p24>, unter Verwendung einer Rücktitration wird ein entsprechendes Antigen, z.B. p24, in einer weiteren Testfläche immobilisiert. Als Nachweisreagenz dient dann ein markierter Antikörper, der

spezifisch für das Antigen ist, z.B. <p24>-Dig, welcher mit dem Analyten, das ist beispielsweise <p24> um die Bindung an das immobilisierte Antigen kompetiert. So kann für den bevorzugten gleichzeitigen Nachweis eines p24-Antigens und des dagegen gerichteten Anti-p24-Antikörpers jeweils das gleiche Nachweisreagenz, beispielsweise AK<p24>-Dig verwendet werden.

Wenn zum Nachweis des Antigens ein Sandwichtest und zum Nachweis des Antikörpers ein Brückentest oder in indirektes Testkonzept verwendet werden, müssen spezielle Testreagenzien verwendet werden, um eine wechselseitige Beeinflussung der Nachweisreagenzien auszuschließen. Bei einem indirekten Testkonzept zum Nachweis eines Antikörpers wird beispielsweise ein Antigen, für das der nachzuweisende Antikörper spezifisch ist, z.B. p24, in einer Testfläche immobilisiert. Zum Nachweis eines Analyten, z.B. <p24>, wird dann ein weiterer markierter Antikörper, beispielsweise <hlgG>-Dig verwendet. Bei der Antigenbestimmung im Sandwich-Format müssen auf der Nachweisseite ein oder mehrere Antikörper, bevorzugt monoklonale Antikörper, eingesetzt werden, deren Epitopbindestellen bekannt sind. Gleichzeitig können bei der Antikörper-Bestimmung im indirekten Testformat oder im Brückenformat keine nativen oder rekombinanten Antigene verwendet werden, die mit den MAK-bindefähigen Epitope enthalten, da sonst eine unerwünschte Reaktion stattfindet. Statt dessen müssen vorbestimmte, rekombinante Antigene ohne diese Epitopbindestellen oder Peptide verwendet werden, an die die eingesetzten <Antigen>-MAKs nicht bindefähig sind. Im Fall der Kombination eines Sandwichtests unter Verwendung von <p24>-Bi und <p24>-Dig. mit einem Brückentest unter Verwendung von p24-Bi und p24-Dig oder mit einem indirekten Testkonzept unter Verwendung von p24-Bi und <h-IgG>-Dig schließt sich hingegen eine gleichzeitige Bestimmung aus.

11.22.05.99

- 15 -

Durch die erfindungsgemäße Multi-epitopanalyse mit Arraysystemen ist es möglich, eine Kombination von Antigen- und Antikörper-Nachweisen für ein bestimmtes Antigen und einen gegen dieses bestimmte Antigen gerichteten Antikörper durchzuführen. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, die bei den
5 im Stand der Technik bekannten Verfahren bestehende diagnostische Lücke zwischen dem ersten Auftreten eines Antigens und dem zeitlich versetzten Auftreten von Antikörpern zu schließen und eine Probe sehr früh als positiv bzw. negativ einzustufen. Üblicherweise werden Proben von Patienten genommen, wobei die Sensitivität eines Tests durch eine möglichst frühe
10 Erkennung von positiven Proben bestimmt wird. Bei einer Infektion treten die verschiedenen Marker, die diese Infektionen anzeigen, wie beispielsweise Antigene oder gegen diese Antigene gerichteten Antikörper mit unterschiedlichem zeitlichen Verlauf auf.

15 Das erfindungsgemäße Multi-epitopverfahren mit einer Arrayanordnung ermöglicht zudem durch die räumlich getrennte Anordnung der einzelnen Testflächen eine spezifische Unterscheidung zwischen Antigen- und Antikörpertests. Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insbesondere bei HIV-Tests erkennbar. Ein bevorzugtes Beispiel für das
20 erfindungsgemäße Verfahren ist der gleichzeitige Nachweis eines HIV-Antigens und dagegen gerichteten Antikörper z.B. des p24-Antigens und des entsprechenden Anti-p24-Antikörpers. Bei einer HIV-Infektion treten zuerst p24-Antigene auf. Diese können mit einem Antigentest, nicht jedoch mit einem Antikörpertest nachgewiesen werden. Nach dem Auftreten der
25 Antigene werden im Körper Antikörper gegen diese Antigene gebildet. Bei den herkömmlichen Kombitests ist es jedoch nicht möglich, den p24-Antigentest mit einem Anti-p24-Antikörpertest zu kombinieren, vielmehr findet eine Kombination des p24-Antigentests mit einem Anti-gp41-Antikörpertest statt. Da die Bildung von Anti-gp41-Antikörpern zeitlich
30 jedoch nach der Bildung von Anti-p24-Antikörpern erfolgen kann, können im Zeitraum bis zur Bildung der Anti-gp41-Antikörper bei herkömmlichen Verfahren falsch negative Ergebnisse erhalten werden. Das

erfindungsgemäße Verfahren ist demgegenüber sicherer, da auch <p24>-Antikörper, wie bei den bisher verwendeten Tests, bestimmt werden können.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt wird die bindefähige Beschichtung der ersten Testfläche, in der das Antigen nachgewiesen werden soll, aus immobilisierten Antikörpern gebildet, die spezifisch für Epitope des nachzuweisenden Antigens sind. Aufgrund der bevorzugt verwendeten Arraystruktur ist es möglich, mehrere Antikörper, die für unterschiedliche

10 Subtypen des nachzuweisenden Antigens spezifisch sind, in separaten Testflächen aufzubringen. Die Antikörper werden entsprechend dem zu analysierenden Antigen ausgewählt. Beim Screening auf eine virale Infektion werden bevorzugt Anti-HIV-I-Antikörper, Anti-HIV-II-Antikörper und Anti-HCV-Antikörper getestet. Analog umfaßt die bindefähige Beschichtung der

15 weiteren Testflächen, auf der ein Antikörper nachgewiesen werden soll, bevorzugt Antigene, die spezifisch für den nachzuweisenden Antikörper sind. Auch hier können grundsätzlich beliebige, auf den jeweiligen Test abgestimmte Antigene verwendet werden, bevorzugt werden Antigene oder Epitope davon aus HIV-I, HIV-II und HCV verwendet.

20 Durch die Verwendung einer nichtporösen Festphase können besonders gute Ergebnisse mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden. Eine nichtporöse Festphase bietet insbesondere Vorteile beim Aufbringen der Testreagenzien, wobei ein definiertes Aufbringen ohne Ineinanderfließen

25 der einzelnen Testflächen möglich ist. Weiterhin ist es bei Verwendung von nichtporösen Testphasen möglich, das Testformat zu miniaturisieren. Bei miniaturisierten Testformaten ist es möglich, eine Vielzahl von Testflächen auf eine einzige nichtporöse Festphase aufzubringen.

30 Der Nachweis der Bindung eines Antigens oder Antikörpers an die Testflächen wird bevorzugt unter Verwendung von markierten Antikörpern durchgeführt, die gegen den Analyten gerichtet sind. Beim Nachweis des

11.22.05.99

- 17 -

Antigens im Sandwichformat wird dabei ein gegen dieses Antigen gerichteter markierter Antikörper verwendet. Der gleiche markierte Antikörper dient auch zum Nachweis des Analyten-Antikörpers beim kompetitiven Format, z.B. einer Rücktitration. Durch räumlich getrennte
5 Auswertung der einzelnen Testflächen ist es somit möglich, mit einem einzigen Nachweisreagenz sowohl Antigen als auch den für dieses Antigen spezifischen Antikörper nachzuweisen, ohne daß sich die beiden Nachweisverfahren gegenseitig beeinträchtigen würden. Geeignete Markierungssubstanzen zur Markierung von Antikörpern sind dem Fachmann
10 bekannt und umfassen z.B. fluoreszierende Gruppen, chemilumineszierende Gruppen, radioaktive Markierungen, Enzymmarkierungen, farbige Markierungen und Solpartikel. Bevorzugt ist die Verwendung eines universellen Nachweisreagenzes, insbesondere von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln.

15 Besonders gute Ergebnisse werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten, wenn die spezifisch bindefähigen Beschichtungen auf die einzelnen Testflächen separat aufgebracht werden. Dadurch ist es möglich, die Bindekapazität der einzelnen Testflächen optimal auszunutzen und optimal
20 bindefähige Beschichtungen herzustellen. Gegebenenfalls können die bindefähigen Reagenzien durch Verdünnermoleküle verdünnt werden, um die Bindefähigkeit der Beschichtung weiter zu verbessern. Geeignete Verdünnermoleküle sind Moleküle, die nicht mit dem zu bestimmenden Analyten binden und die auch keine unspezifische Wechselwirkung oder
25 Bindung zu anderen Probenbestandteilen zeigen, was zu falschpositiven Ergebnissen führen könnte (vgl. WO92/10757, EP 0 664 452 A2). Besonders bevorzugt wird die Beschichtung in den einzelnen Testflächen jeweils aus einem einzigen spezifisch bindefähigen Molekültyp gebildet. Unterschiedliche, mit dem Analyten bindefähige Reagenzien werden dabei
30 in verschiedene Testspots aufgebracht. Auf diese Weise ist es möglich, die Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter zu erhöhen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers, umfassend mindestens eine erste Testfläche und mindestens eine zweite Testfläche, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß die erste Testfläche eine spezifisch mit einem Antigen bindefähige Beschichtung aufweist und die zweite Testfläche eine spezifisch mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper bindefähigen Beschichtung aufweist, wobei die Beschichtungen homogen sind und jeweils nur einen einzigen Typ eines bindefähigen Reagenzes enthalten. Die Beschichtungen sind gleichmäßig auf die Testflächen aufgebracht, das heißt, sie sind homogen. Neben dem bindefähigen Reagenz können die Testflächen inerte Verdünnermoleküle umfassen, die weder mit dem nachzuweisenden Analyten noch mit anderen Probenbestandteilen Wechselwirkungen eingehen können.

15

Während grundsätzlich beliebige Trägermaterialien verwendet werden können, sind die Testflächen der erfindungsgemäßen Festphase bevorzugt auf einen nichtporösen Träger aufgebracht. Durch die Verwendung von nichtporösen Oberflächen ist insbesondere eine Miniaturisierung des Testformates und die gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl von Testflächen.

20

Die erfindungsgemäße Festphase eignet sich insbesondere zur Verwendung in einem Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers. Auf diese Weise ist es möglich, die Sensitivität und Zuverlässigkeit von Immuntests weiter zu verbessern.

25

Die Erfindung umfasst auch einen Testkit zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers, welches die erfindungsgemäße Festphase sowie markierte Nachweisreagenzien zum Nachweis von an die Testflächen gebundenem

30

Antigen und Antikörper umfasst. Geeignete Nachweisreagenzien sind beispielsweise markierte Antikörper, wobei die Markierung aus den oben genannten Gruppen ausgewählt sein kann.

- 5 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

Beispiele

1. Durchführung eines <HIV>-Tests mit mehreren Antigen-spezifischen Testflächen mittels Microspot-Technologie

Microspot ist eine miniaturisierte ultrasensitive Technologie, die ideal zur gleichzeitigen Bestimmung von verschiedenen Parametern in einem einzigen Meßvorgang geeignet ist. Im Fall der <HIV>-Bestimmung sind die einzelnen HIV-Antigene in sogenannten "Arrays" auf einem Polystyrolträger immobilisiert. Die verschiedenen HIV-Antigene werden als Spots mittels einer zur Inkjet-Technologie verwandten Technologie auf das Testfeld aufgebracht. Bei der Testdurchführung werden auf die Testfläche 30 µl mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnte Probe pipettiert und 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und Waschen des Testfeldes mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung 1, die eine Mischung aller Digoxigenin-markierten HIV-Antigene enthält, auf das Testfeld pipettiert und wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Reagenzlösung 1 und Waschen des Testfeldes mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung 2 mit Nachweisreagenz auf das Testfeld pipettiert. Als Nachweisreagenz dienen 100 nm große, fluoreszenzgefärbte Latexpartikel, die kovalent mit einem <Digoxigenin>-Antikörper beschichtet sind.

- 30 Dieses Nachweisreagenz wird wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und trockengesaugt. Das Testfeld wird mit einem He-Ne-Laser mit 633 nm

Wellenlänge bestrahlt und die Fluoreszenz bei 670 nm Wellenlänge mit einer CCD-Kamera vermessen.

Die Festphase besteht aus folgenden spezifischen Testflächen:

- 5 - rek. p24
- rek. Reverse Transcriptase
- gp41-Peptidepitop 1
- gp41-Peptidepitop 2

10 Als Probenpuffer wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 7,6 mit folgenden Zusätzen verwendet: 0,05% Tween 20, 0,5% RSA, 0,1% Rinder-IgG, 0,01% Methylisothiazolon, 3% Pepton.

15 Als Reagenzlösung 1 wurde der oben beschriebene Probenpuffer verwendet, der folgende testspezifische Antigene enthält:

- Digoxigenin markiertes, rekombinantes p24
- Digoxigenin markierte, rekominante Reverse Transcriptase
- Digoxigenin markiertes gp41-Peptidepitop 1
- Digoxigenin markiertes gp41-Peptidepitop 2

20

Als Reagenzlösung 2 wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit folgenden Zusätzen verwendet: 0,05% Tween 20, 0,9% NaCl, 0,5% RSA, 0,1% Na-azid und 0,01% des fluoreszenzmarkierten Latexpartikels, welche mit MAK < Digoxigenin > beschichtet wurden

25

2. Testergebnisse des <HIV> Microspot-Tests im Vergleich zu einer konventionellen Methode mit Antigengemischen oder Westernblot

In diesem Versuch wurden sogenannte Serokonversionsproben vermessen.

30 Diese Proben sind zeitlich aufeinanderfolgende Abnahmen verschiedener Personen, deren Serumbefund von HIV-negativ nach HIV-positiv konvertiert.

Je sensitiver eine Testmethode ist, desto früher wird ein HIV-spezifisches

Antikörper-Signal gemessen. In diesem Versuch wurden die Proben mit der erfindungsgemäßen Methode (Microspot) und vergleichend mit einer konventionellen Routine-Methode (Enzymun®) vermessen. Die verwendeten, HIV-spezifischen Einsatzstoffe waren in beiden Testsystemen identisch und unterscheiden sich vor allem durch die getrennte Einzelspot-Analyse. In der nachfolgenden Tabelle sind die Cut-off-Indices ($\text{Cut-off-Index} = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Untergrund}}}{2 \times \text{Signal}_{\text{Negativkontrolle}}}$) der beiden Methoden aufgetragen und zusätzlich mit Westernblot-Daten verglichen:

| Serokonversions-Panel der Fa. BBI | Tag der Abnahme | p24 | RT | gp41-Peptid 1 | gp41-Peptid 2 | Western-Blot | Enzymun® |
|-----------------------------------|-----------------|------|-----|---------------|---------------|--------------|----------|
| R 2. Abnahme | 2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | negativ | 0.5 |
| 3. Abnahme | 7 | 22.2 | 0.0 | 0.0 | 2.4 | indifferent | 15.4 |
| 4. Abnahme | 13 | 17.4 | 2.6 | 4.4 | 36.4 | positiv | 36.0 |
| AB 1. Abnahme | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | negativ | 0.3 |
| 2. Abnahme | 28 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 1.1 | negativ | 0.7 |
| 3. Abnahme | 33 | 0.0 | 0.0 | 5.5 | 54.4 | negativ | 24.2 |
| 4. Abnahme | 35 | 0.8 | 0.2 | 6.0 | 33.2 | positiv | 26.7 |
| 5. Abnahme | 37 | 15.2 | 5.1 | 4.6 | 33.0 | positiv | 28.9 |
| AD 5. Abnahme | 21 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | negativ | 0.3 |
| 6. Abnahme | 25 | 0.2 | 0.0 | 1.6 | 3.7 | positiv | 0.9 |
| 7. Abnahme | 28 | 14.1 | 0.3 | 11.1 | 65.5 | positiv | 24.5 |
| AG 3. Abnahme | 13 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | negativ | 0.4 |
| 4. Abnahme | 27 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | negativ | 0.6 |
| 5. Abnahme | 34 | 6.0 | 5.3 | 0.0 | 106.9 | positiv | 8.1 |
| 6. Abnahme | 50 | 6.1 | 5.4 | 0.0 | 65.4 | positiv | 3.1 |
| 7. Abnahme | 78 | 1.0 | 6.8 | 0.0 | 23.9 | positiv | 1.6 |
| 8. Abnahme | 163 | 1.5 | 5.3 | 0.0 | 4.9 | positiv | 0.6 |
| 9. Abnahme | 194 | 2.3 | 2.5 | 0.0 | 2.8 | positiv | 0.7 |
| AI 1. Abnahme | 0 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.1 | indifferent | 0.8 |
| 2. Abnahme | 7 | 0.6 | 0.5 | 54.7 | 44.9 | positiv | 30.2 |
| 3. Abnahme | 11 | 1.1 | 0.7 | 18.8 | 22.5 | positiv | 30.2 |

Dieser Vergleich zeigt deutlich, daß durch die Aufteilung in Einzelspots mit den optimalen Konzentrationen die Sensitivität des <HIV>-Tests im Vergleich zum konventionellen Routinetest deutlich verbessert werden konnte. Von den 5 Serokonversions-Panels werden 7 Abnahmen früher

11.22.05.99

- 22 -

positiv erkannt. Die entspricht je nach Panel einer früheren Detektion der HIV-Infektion von 3 bis 7 Tagen. Auch im Vergleich zum Westernblot wurde eine deutliche Steigerung der Sensitivität mit 6 früher erkannten Abnahmen erreicht.

11.22.08.99

- 23 -

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend
5 die Schritte:
 - (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger
und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt,
wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte
10 analytspezifische Rezeptoren enthalten, die spezifisch an
verschiedene Epitope des zu bestimmenden Analyten binden,
 - (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens
einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine
signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden
Gruppe bindefähig ist und
 - 15 (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des
Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf
der Festphase.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
daß der nachzuweisende Analyt ein Erreger oder/und ein Pathogen
ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß der Nachweis des Analyten auf mindestens zwei räumlich
getrennten Testflächen als positives Testergebnis gewertet wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
30 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase durch separates, direktes spezifisches Aufbringen
der unterschiedlichen ersten analytspezifischen Rezeptoren auf die
räumlich getrennten Testflächen hergestellt wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtung auf den Testflächen jeweils aus einem einzigen
bindefähigen Molekültyp gebildet wird.
7. Verfahren nach einem vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Festphase verwendet, die zusätzlich mindestens eine
Kontrollfläche umfaßt, die keinen analytspezifischen Rezeptor enthält.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß zum Nachweis aus dem Analyten und damit bindefähigen
Reagenzien gebildeten Komplexen ein universelles Nachweisreagenz,
insbesondere markierte Latexpartikel verwendet werden.
9. Festphase zum Nachweis eines Analyten in einer Probe,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich
getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils
unterschiedliche Reagenzien enthalten, die spezifisch den zu
bestimmenden Analyten binden.

11.22.08.99

- 25 -

10. Festphase nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien enthalten,
die an verschiedene Epitope oder/und Subtypen des Analyten binden.

5

11. Festphase nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der nichtporöse Träger aus Polystyrol gebildet ist.

10

12. Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.

15

13. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 8 bis 10 in
einem Immunoassay.

20

14. Testkit zum Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend eine
Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 12 sowie markierte
Nachweisreagenzien.

25

15. Testkit nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als universelles Nachweisreagenz markierte Latexpartikel
enthält.

30

16. Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines
spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer
Probe gelöst, umfassend die Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Festphase auf der in einer ersten Testfläche
ein mit dem zu bestimmenden Antigen bindefähiger
immobilisierter Rezeptor und in einer räumlich davon

getrennten zweiten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähiger immobilisierter Rezeptor aufgebracht ist,

5

- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

10

- 17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antigens unter Verwendung eines Sandwich-Tests durchgeführt wird.

15

- 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines Rücktitrationskonzepts durchgeführt wird.

20

- 19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines Brückenkonzepts durchgeführt wird.

25

- 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines indirekten Testformats durchgeführt wird.

30

11.22.08.99

- 27 -

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die bindefähige Beschichtung der ersten Testfläche aus
immobilisierten Antikörpern gebildet wird, die spezifisch für Epitop
des nachzuweisenden Antigens sind.

5

22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß Antikörper, die für unterschiedliche Subtypen des
nachzuweisenden Antigens spezifisch sind, in separaten Testflächen
aufgebracht werden.

10

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper ausgewählt wird aus viralen Antikörpern,
insbesondere Anti-HIV-I-Antikörpern, Anti-HIV-II-Antikörpern und
Anti-HCV-Antikörpern.

15

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß die bindefähige Beschichtung der zweiten Testfläche aus
Antigenen gebildet wird, die spezifisch für den nachzuweisenden
Antikörper sind.

20

25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Antigene ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus
HIV-I, HIV-II und HCV.

25

30

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem zu bestimmenden Antigen um p24 und bei dem
zu bestimmenden Antikörper um anti-p24 handelt.
- 5 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine nichtporöse Festphase verwendet wird.
- 10 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis unter Verwendung von markierten Antikörpern, die
gegen die Analyten gerichtet sind, durchgeführt wird.
- 15 29. Verfahren nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung ausgewählt wird aus fluoreszierenden Gruppen,
chemilumineszierenden Gruppen, radioaktiven Markierungen,
Enzymmarkierungen, farbigen Markierungen und Solpartikeln.
- 20 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis unter Verwendung eines universellen
Nachweisreagenzes, insbesondere markierten Latexpartikeln,
25 durchgeführt wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase durch direktes, separates Aufbringen der
spezifisch bindefähigen Beschichtungen auf die einzelnen Testflächen
30 hergestellt wird.

11.22.08.99

- 29 -

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtung auf den Testflächen jeweils aus einem einzigen
bindefähigen Molekültyp gebildet wird.

5

33. Festphase, zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines
spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer
Probe, umfassend mindestens eine erste Testfläche und mindestens
eine zweite Testfläche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste Testfläche eine spezifisch mit einem Antigen
bindefähige Beschichtung aufweist und die zweite Testfläche eine
spezifisch mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper
bindefähige Beschichtung aufweist.

10

15

34. Festphase nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtungen homogen sind und jeweils nur einen einzigen
Typ eines bindefähigen Reagenzes enthalten.

20

35. Festphase nach Anspruch 33 oder 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen auf einen nichtporösen Träger aufgebracht sind.

25

36. Festphase nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß der nichtporöse Träger aus Polystyrol gebildet ist.

30

37. Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß die einzelnen Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.

38. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 37 in einem Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers.
- 5 39. Testkit zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers umfassend eine Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 38 sowie markierte Nachweisreagenzien.
- 10 40. Testkit nach Anspruch 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein universelles Nachweisreagenz umfaßt.

M 22.06.99

- 31 -

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe beschrieben, umfassend die Schritte:

5

(a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, erste analytspezifische Rezeptoren enthalten, die spezifisch an mehrere verschiedene Epitope des zu bestimmenden Analyten binden,

10

(b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem zweiten analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und

(c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

15

vo 03.06.98 10:40

THIS PAGE BLANK (USPTO)